蛋氨酸三肽对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白和小肽转运载体基因表达量的影响

郭春利　丹　妮　曹琪娜　哈斯额尔顿　敖长金*

（内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018）

摘　要：本试验旨在研究蛋氨酸三肽（Met-Met-Met）对奶牛乳腺上皮细胞（BMECs）酪蛋白和小肽转运载体基因表达量的影响。采用酶消化法培养的第 3 代奶牛乳腺上皮细胞为模型，各处理在培养基中分别添加 0（对照）、40、50、60、70 和 80 μg/mL 的蛋氨酸三肽，每个处理 5 个重复，每个重复 1 个培养孔，分别培养细胞 24、48 和 72 h，检测奶牛乳腺上皮细胞的相对增殖率，整体试验重复 2 次，确定最佳培养时间；各处理在培养基中分别添加 0（对照）、40、50、60、70 和 80 μg/mL 的蛋氨酸三肽，每个处理 3 个重复，每个重复 1 个培养孔，以最佳培养时间培养，用实时定量 PCR 法检测酪蛋白基因的表达量，确定适宜蛋氨酸三肽浓度，整体试验重复 3 次；以最佳培养时间和适宜蛋氨酸三肽浓度培养细胞，以未添加蛋氨酸三肽的培养基为对照，每个处理 3 个重复，每个重复 1 个培养孔，测定小肽转运载体基因的表达量，整体试验重复 3 次。结果表明：在培养基中添加蛋氨酸三肽培养奶牛乳腺上皮细胞 24 h 时，相对增殖率最高；培养基中加入 60 μg/mL 的蛋氨酸三肽培养细胞 24 h，α_{s1}-酪蛋白和 β-酪蛋白的基因表达量最高，同时发现奶牛乳腺上皮细胞中小肽转运载体 1 和小肽转运载体 2 基因表达量显著高于对照处理（$P<0.05$）。综上所述，培养基中添加 60 μg/mL 的蛋氨酸三肽能够提高奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白和肽转运载体基因的表达量。

关键词：蛋氨酸三肽；奶牛乳腺上皮细胞；酪蛋白；小肽转运载体

中图分类号：S823

乳蛋白是评价牛奶品质的重要指标之一。酪蛋白含量占总乳蛋白含量的 80%，它包括 α_{s1}-酪蛋白（CSN1S1）、α_{s2}-酪蛋白（CSN1S2）、β-酪蛋白（CSN2）和 κ-酪蛋白（CSN3）4 种，这 4 种酪蛋白的比例分别为 36.5%~40.7%、9.7%~10.2%、26.8%~30.5%、6.8%~9.7%[1]。前人研究认为游离氨基酸是可以满足动物机体各组织合成代谢的需要[2]，但新近的研究发

收稿日期：2017-03-01

基金项目：国家奶业“973 计划”项目（2011CB100803）

作者简介：郭春利（1992—），女，吉林长春人，硕士研究生，从事奶牛营养研究。E-mail：gclgcl02@foxmail.com

*通信作者：敖长金，教授，博士生导师，E-mail： changjinao@aliyun.com

现，在反刍动物体内存在着小肽吸收的过程，其血液循环中的小肽可以参与奶牛乳腺上皮细胞（BMECs）的乳蛋白合成，并在一定程度上弥补了乳腺合成乳蛋白过程中游离氨基酸摄入不足的问题[3]。Backwell 等[4]给泌乳奶牛提供以二肽形式结合的组氨酸和相同数量的游离组氨酸,试验结果表明前者可以促进乳腺合成更多的乳蛋白。Wang[5]发现在 BMECs 培养时加入氨基酸二肽，可以使细胞合成乳蛋白量的提高。高学军等[6]也在培养 BMECs 的过程中添加了不同浓度的蛋氨酸-蛋氨酸二肽、蛋氨酸-赖氨酸二肽、赖氨酸-赖氨酸二肽和赖氨酸-蛋氨酸二肽，并已证实添加适宜浓度的二肽可以促进 *CSN*2 基因和蛋白的表达。

目前已经证明奶牛乳腺组织内存在 2 种小肽转运载体，即小肽转运载体 1（PepT1）和小肽转运载体 2（PepT2）[7-8]。这 2 种载体是根据自身系统内部的定向质子梯度和负膜电位来发挥其转运作用[9-10]，它们可以转运大部分二肽和三肽，但一般不能转运 3 个以上氨基酸残基构成的肽[1,4]。

在 BMECs 合成乳蛋白的研究过程中，关于第 1 限制性氨基酸蛋氨酸所组成的二肽已经有了初步的研究，但对蛋氨酸三肽（methionyl-methionyl-methionine,Met-Met-Met）的研究未见报道。所以本试验在 BMECs 培养过程中添加不同浓度的蛋氨酸三肽，研究其对 BMECs 相对增殖率、酪蛋白和小肽转运载体基因表达量的影响，以期为提高乳蛋白产量和改善牛奶品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

DMEM/F12 培养基、II型胶原酶、双抗（青霉素-链霉素）、0.25%胰蛋白酶/乙二胺四乙酸（EDTA）、胰岛素转铁蛋白溶液均购自 Gibco 公司；胎牛血清（FBS）购自 BI 公司；组织/细胞总 RNA 提取试剂盒（DP431）购自 TIANGE 公司；PrimeScript^{RT} Master Mix 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq^{TM} II、ABI Prism^{TM} （KR0390−v8.13）、6×上样缓冲液、DL 2000 分子质量标准均购自上海 TAKARA 公司；氢化可的松购自 Sigma 公司；噻唑蓝（MTT）、二甲基亚基砜（DMSO）和两性霉素 B 均购自 Amresco 公司；磷酸盐缓冲液（DPBS）购自 HyClone 公司；蛋氨酸三肽由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，合成报告显示蛋氨酸三肽纯度为 98.10%，相对分子质量为 411.61。

主要仪器有：二氧化碳（CO_2）恒温培养（HF-240，力康生物医疗科技控股有限公司）；

倒置显微镜（Olympuse 公司）；全自动酶标仪（Synergy H4,Bio Tek 公司）；梯度 PCR 仪（Veriti Thermal Cycler，Thermo 公司）；实时定量 PCR 仪和电泳仪（Bio-Rad 公司）。

1.2 试验设计

本试验采用单因素完全随机试验设计。各处理在培养基中分别添加 0（对照）、40、50、60、70 和 80 μg/mL 的蛋氨酸三肽，每个处理 5 个重复，每个重复 1 个培养孔，分别培养细胞 24、48 和 72 h，检测 BMECs 的相对增殖率（relative growth rate，RGR），整体试验重复 2 次，确定最佳培养时间；各处理在培养基中分别添加 0（对照）、40、50、60、70 和 80 μg/mL 的蛋氨酸三肽，每个处理 3 个重复，每个重复 1 个培养孔，以最佳培养时间培养，用实时定量 PCR 法检测酪蛋白基因的表达量，确定适宜蛋氨酸三肽浓度，整体试验重复 3 次；以最佳培养时间和适宜蛋氨酸三肽浓度培养细胞，以未添加蛋氨酸三肽的培养基为对照，每个处理 3 个重复，每个重复 1 个培养孔，测定小肽转运载体基因的表达量，整体试验重复 3 次。

1.3 BMECs 培养方法

BMECs 采用酶消化法获得。取健康的荷斯坦奶牛乳腺组织（内蒙古呼和浩特北亚清真冷库），分离去除组织表面，在深层组织剪取约 1 cm^3 的组织块若干，放入预冷的 DPBS 中。将组织块放入超净台，用 DPBS 将组织块洗净后，再剪去组织块表层并将去表层的组织块在离心管中剪成糊状，1:1 加入 0.5%胶原酶 II溶液。将消化液和组织混匀后在 37 ℃的 5% CO_2 条件下消化 1 h，每隔 20 min 摇晃离心管。消化液用孔径 80 目的细胞滤网过滤，收集细胞滤液，1 300 r/min 离心 5 min，弃上清。加入 BMECs 诱导培养基（每 100 mL 的 DMEM/F12 培养基中加入 10% FBS、1 mL 青霉素-链霉素、0.5 mL 胰岛素转铁蛋白、100 μL 两性酶素 B、100 μL 氢化可的松），吹打均匀，转移至 25 cm^2 细胞培养瓶中，于 37 ℃的 5% CO_2 的条件下培养。每日观察细胞的生长情况，待细胞生长至 85%~95% 融合度时，根据 BMECs 与奶牛乳腺成纤维细胞对胰蛋白酶消化敏感性不同的特点，纯化 BMECs 并进行传代。本试验采用第 3 代传代细胞进行研究。

1.4 测试指标与方法

1.4.1 MTT 法检测相对增殖率

细胞相对增殖率检测采用 MTT 法[12]进行，用以判定细胞活力。收集第 3 代 BMECs，

用 BMECs 诱导培养基悬浮细胞，将细胞悬浮液以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔培养板（Corning，3599）上，置于 37 ℃的 5% CO_2 培养箱中，培养 48 h 后吸出各孔内培养液，培养基换成无血清的 BMECs 诱导培养基饥饿培养 24 h，添加含不同浓度蛋氨酸三肽的无血清诱导培养基，继续培养 24、48、72 h；在培养结束前 4 h，每孔加入 20 μL MTT（5 mg/mL）；4 h 后弃上清液，每孔加入 150 μL DMSO，振荡 10 min 后，用全自动酶标仪检测各培养孔的 490 nm 吸光度（OD_{490}nm）值。每个处理 5 个重复，每个重复 1 个培养孔，整体试验重复 2 次。相对增殖率计算公式如下：

$$\text{相对增殖率（\%）}=\text{（试验处理 } OD_{490\ nm}\text{/对照处理 } OD_{490\ nm}\text{）}\times100\text{。}$$

1.4.2　实时定量 PCR 法检测酪蛋白基因表达量

将培养至第 3 代的 BMECs，以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔培养板（Corning，3599）上，置于 37 ℃的 5% CO_2 培养箱中，培养 48 h 后吸出各孔内培养液，培养基换成无血清的 BMECs 诱导培养基饥饿培养 24 h，添加含不同浓度蛋氨酸三肽的无血清诱导培养基，每个处理 3 个重复，每个重复 1 个培养孔，按照相对增殖率最佳的培养时间进行细胞培养，培养结束后，将细胞总 RNA 按照组织/细胞总 RNA 提取试剂盒的方法进行提取，总 RNA 的完整性和纯度用 1%的琼脂糖凝胶电泳和酶标仪进行检测。反转录 PCR 按照 PrimeScript^{RT} Master Mix 试剂盒的方法进行，得到的 cDNA 用 SYBR Premix Ex Taq^{TM} Ⅱ试剂盒进行实时定量 PCR，反应体系为 20 μL，每个重复进行 3 次 PCR 检测。以本实验室常用的磷酸甘油醛脱氢酶（*GAPDH*）作为内参基因，对 *CSN1S1*、*CSN1S2*、*CSN2* 和 *CSN3* 基因的表达量进行测定，引物序列及参数见表 1。实时定量 PCR 的反应程序为：95.0 ℃预变性 30 s；95.0 ℃变性 30 s；退火温度下 30 s；72.0 ℃延伸 20 s，40 个循环。熔解曲线程序为：70~95 ℃，每 6 s 升温 0.5 ℃，共 51 个循环，实时定量 PCR 结果采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行相对定量分析。

1.4.3　实时定量 PCR 法检测小肽转运载体基因表达量

按照根据相对增殖率得到的最佳培养时间及根据酪蛋白基因表达量得到的适宜蛋氨酸三肽浓度对第 3 代接种于 6 孔板的 BMECs 进行培养，每个处理 3 个重复，每个重复 1 个培养孔。培养结束后，进行总 RNA 提取及反转录。以磷酸甘油醛脱氢酶（*GAPDH*）作为内参基因，对小肽转运载体（*PepT*1 和 *PepT*2）基因的表达量进行测定，引物序列及参数见表 1。实时定量 PCR 的反应程序及熔解曲线程序同 1.4.2，实时定量 PCR 结果采用 $2^{-\triangle\triangle}$Ct 法进行

相对定量分析。

表 1　引物序列及参数

Table 1　Primer sequences and parameters

基因 Genes	引物序列 Primer sequences(5'—3')	GenBank 登录号 GenBank No.	长度 Length/bp	退火温度 Tm/℃	参考文献 References
α_{s1}-酪蛋白 *CSN1S1*	F:AATCCATGCCCAACAGAAAG R:TCAGAGCCAATGGGATTAGG	BC109618	189	59.0	Zhou 等[13]
α_{s2}-酪蛋白 *CSN1S2*	F:AGCTCTCCACCAGTGAGGAA R:GCAAGGCGAATTTCTGGTAA	NM-174528.2	150	56.0	张兴夫[14]
β-酪蛋白 *CSN2*	F:GTGAGGAACAGCAGCAAACA R:CCAGGAGCAAAACCAAGAAC	NM-181008	115	55.0	Zhou 等[13]
κ-酪蛋白 *CSN3*	F:CCAGGAGCAAAACCAAGAAC R:TGCAACTGGTTTCTGTTGGT	NM-174294	148	56.0	Zhou 等[13]
小肽转运载体 1 *PepT1*	F:TGGTCAATGAGTTCTGCGAAAG R:CGAGGATGGGCGTTAGGTAG	HC-402477	150	55.8	崔艳[8]
小肽转运载体 2 *PepT2*	F:ATGGCAATGCCCAATGAA R:CACCAACACAGCAACAAACAAA	NM-001079582	189	59.0	常晨城[15]
磷酸甘油醛脱氢酶 *GAPDH*	F:GGGTCATCATCTCTGCACCT R:GGTCATAAGTCCCTCCACGA	XM-001252479	177	60.0	Zhou 等[13]

F：上游引物；R：下游引物。

F: forward primer；　R: reverse primer.

1.5　数据统计分析

试验数据采用 SAS 9.0 软件进行统计，对相对增殖率、酪蛋白基因表达量数据进行方差分析，同时一次线性和二次曲线回归分析；小肽转运载体基因的表达量进行 t 检验。P<0.05 为差异显著。

2　结　果

2.1　蛋氨酸三肽浓度与培养时间对 BMECs 相对增殖率的影响

由表 2 可知，添加不同浓度的蛋氨酸三肽培养细胞 24 h 时，相对增殖率随着蛋氨酸三肽浓度的增加呈一次线性变化（P=0.101 2），以 50 μg/mL 剂量组最高，回归方程为 Y=-0.003 47X+1.223 74，R^2=0.646 1，式中 X 表示蛋氨酸三肽浓度，Y 表示相对增殖率，回归曲线拟合程度低；当培养 48 h 时，随着蛋氨酸三肽浓度的升高，相对增殖率呈现先降低后升高的二次曲线变化（P=0.276 2），回归方程为 Y=0.000 1X^2-0.014 1X+1.375 8，R^2=0.723 8，式中

X 表示蛋氨酸三肽浓度，Y 表示相对增殖率，即细胞培养 48 h 时，BMECs 会由于蛋氨酸浓度的升高呈现先抑制后促进生长的变化，但与回归曲线拟合程度较低；当培养 72 h 时，细胞也随着蛋氨酸三肽浓度的升高呈现与 48 h 时相同的二次曲线变化趋势（P=0.006 0），回归方程为 $Y=0.000\ 1X^2-0.006\ 2X+1.0524$，$R^2=0.994\ 0$，式中 X 表示蛋氨酸浓度，Y 表示相对增殖率，即当培养 72 h 时，BMECs 会随着蛋氨酸三肽浓度的升高呈现先抑制后促进生长的变化。在培养基中加入 50 μg/mL 的蛋氨酸三肽培养细胞 24 h 后，相对增殖率最强，最佳培养时间为 24 h。

表 2　蛋氨酸三肽浓度与培养时间对 BMECs 相对增殖率的影响

Table 2　Effects of Met-Met-Met concentration and culture time on RGR of BMECs　　%

培养时间 Culture time/h	蛋氨酸三肽浓度 Met-Met-Met concentration/(μg/mL)						SEM	P 值 P-value		
	0	40	50	60	70	80		处理 Treatment	一次 Linear	二次 Quadratic
24	100.00^{c}	104.53^{b}	109.65^{a}	104.77^{b}	93.80^{d}	95.51^{d}	0.08	0.001 3	0.101 2	0.281 3
48	100.00^{ab}	102.22^{ab}	99.05^{a}	97.15^{b}	105.16^{ab}	106.01^{ab}	0.03	0.081 1	0.320 0	0.276 2
72	100.00^{ab}	99.36^{b}	93.81^{b}	97.35^{ab}	100.44^{ab}	106.64^{a}	0.01	0.001 8	0.009 6	0.006 0

同行数据肩标相同或无字母表示差异不显著（P>0.05），不同字母表示差异显著（P<0.05）。下表同。

Values in the same column with the same or no letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), while with different letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as below.

2.2　蛋氨酸三肽浓度对 BMECs 酪蛋白基因表达量的影响

由表 3 可知，培养 24 h 后，随着蛋氨酸三肽浓度的增加，BMECs 内 *CSN*1*S*1、*CSN*1*S*2 和 *CSN*2 基因的表达量都呈先增加后降低二次曲线趋势变化，回归方程分别为：$Y=-0.000\ 9X^2+0.119\ 4X-2.889\ 4$，$R^2=0.729\ 0$，$P$=0.271 0；$Y=-0.000\ 5X^2+0.074\ 0X-1.591\ 1$，$R^2=0.916\ 5$,$P$=0.083 5；$Y=-0.001\ 3X^2+0.156\ 6X-3.750\ 3$，$R^2=0.887\ 2$,$P$=0.112 8，式中 X 表示蛋氨酸三肽浓度，Y 表示基因表达量；说明 *CSN*1*S*1、*CSN*1*S*2 和 *CSN*2 基因的表达量与蛋氨酸三肽浓度之间存在剂量依赖关系,但相关并不显著（P>0.05）；而 *CSN*3 基因的表达量是随着蛋氨酸三肽浓度的增加呈现先降低后升高的变化趋势，回归方程为 $Y=0.000\ 7X^2-0.084\ 5X+3.298\ 3$，$R^2=0.921\ 1$，$P$=0.078 9，式中 X 表示蛋氨酸三肽浓度，Y 表示基因表达量。综合来看，60 μg/mL 对蛋氨酸三肽对酪蛋白基因表达的促进作用较好。

表 3　蛋氨酸三肽浓度对 BMECs 酪蛋白基因表达量的影响

Table 3　Effects of Met-Met-Met concentration on expression levels of casein genes in BMECs

基因 Genes	蛋氨酸三肽浓度 Met-Met-Met concentration/(μg/mL)						SEM	P 值 P-value		
	0	40	50	60	70	80		处理 Treatment	一次 Linear	二次 Quadratic
αs1-酪蛋白 *CSN1S1*	1.00[a]	0.44[e]	0.58[d]	1.08[a]	0.81[b]	0.68[c]	0.03	＜0.000 1	0.434 6	0.271 0
αs2-酪蛋白 *CSN1S2*	1.00[a]	0.56[d]	0.72[c]	0.94[b]	1.08[a]	0.91[b]	0.03	＜0.000 1	0.085 9	0.083 5
β-酪蛋白 *CSN2*	1.00[a]	0.43[c]	0.75[b]	1.06[a]	0.70[b]	0.44[c]	0.03	＜0.000 1	0.976 7	0.112 8
κ-酪蛋白 *CSN3*	1.00[a]	1.00[a]	0.66[c]	0.60[d]	0.66[c]	0.72[b]	0.02	＜0.000 1	0.325 3	0.078 9

2.3　适宜浓度蛋氨酸三肽对 BMECs 中 *PepT*1 和 *PepT*2 基因表达量的影响

由表 4 可知，与对照处理相比，60 μg/mL 的蛋氨酸三肽能显著上调 *PepT*1 和 *PepT*2 的基因表达量（P<0.05）。

表 4　适宜浓度蛋氨酸三肽对 BMECs 中 *PepT*1 和 *PepT*2 基因表达量的影响

Table 4　Effects of Met-Met-Met at proper concentration on expression levels of *PepT*1 and *PepT*2 genes in BMECs

基因 Genes	蛋氨酸三肽浓度 Met-Met-Met concentration/(μg/mL)		SEM	P 值 P-value
	0	60		
小肽转运载体 1 *PepT*1	1.00	1.76	0.10	0.018 1
小肽转运载体 2 *PepT*2	1.00	1.55	0.05	0.007 2

3　讨　论

牛奶中 90%的乳蛋白是由奶牛乳腺组织以血液中的游离氨基酸为原料合成的，但仍有10%是以氨基酸结合成小肽形式用于乳蛋白的合成[1, 4]。小肽在被动物组织吸收利用的过程中主要依赖于其独立的转运载体系统，它是通过氢离子（H^+）和钙离子（Ca^{2+}）的逆浓度梯度进行转运的，并且小肽转运载体具有转运速率快、吸收耗能低且不易饱和的优点[16]，而氨基酸转运载体根据氨基酸种类不同有不同的转运载体及转运方式，且耗能多载体少[17]，因此动物组织对小肽的利用效率在理论上要高于游离氨基酸的利用效率。小肽转运载体主要存在于溶质转运体 15（solute carrier 15，SLC15）家族，其中 PepT1 和 PepT2 是泌乳动物转运小肽的重要转运体，利用电子梯度逆浓度将大多数二肽、三肽等小肽以及许多拟肽物从胞外转运到胞内[18-19]，PepT1 是一种广谱的，对底物起着低亲合力、高容量的转运性能的转运载体，而 PepT2 表现的特性恰恰与 PepT1 相反，呈现底物亲合力高，低容量的性能[20]。崔

艳[8]在 BMECs 培养的过程中，向培养基中添加苏氨酸-苯丙氨酸-苯丙氨酸（Thr-Phe-Phe）三肽，发现 *PepT*1 基因的表达显著增强；同时 Zhou 等[21-22]通过抑制泌乳奶牛乳腺外植体中 *PepT*2 的转运功能，发现乳蛋白合成量显著减少，并且在体外培养的 BMECs 能摄取苯丙氨酸-苯丙氨酸二肽（Phe-Phe）促进 *PepT*2 基因的表达并用于乳蛋白的合成，说明 *PepT*1 和 *PepT*2 在乳腺摄取小肽的过程中均发挥着重要的作用。

相对增殖率是用来反映细胞活力和增殖的重要指标。在本研究中发现，蛋氨酸三肽作为酪蛋白合成的前体物时对 BMECs 活力的调节作用呈浓度依赖关系。当蛋氨酸三肽添加后，随着细胞培养时间的延长，出现不同的细胞增殖变化趋势；在培养 24 h 时，细胞相对增殖率，即活力最高，这与二肽适宜培养时间不同[23]，可能是由于三肽中氨基酸残基个数大于二肽，在进入细胞后加速了细胞增殖代谢的过程，所以长时间的培养细胞可能导致细胞在培养过程中出现营养不足，或因长时间培养的过程中细胞在培养板中生长过多，代谢产生一些不利于细胞增殖的物质而使细胞的生长过程受到抑制。

以最佳培养时间培养细胞，发现蛋氨酸三肽浓度为 60 μg/mL 时，*CSN*1*S*1 和 *CSN*2 基因表达量最高；当浓度达到 70 μg/mL 时，*CSN*1*S*2 基因表达量最高；但 *CSN*3 基因呈现先降低后升高的趋势，其原因可能是由于 CSN3 的主要作用是防止乳蛋白凝集沉淀[24]，所以在体外试验中 *CSN*3 基因出现了一定程度的下降。本试验结果表明，在培养基中加入不同浓度蛋氨酸三肽培养 24 h 后，在浓度为 60 μg/mL 时 *CSN*1*S*1 和 *CSN*2 基因的表达量最高，而 *CSN*3 基因表达出现抑制，这可能是由于 CSN3 在合成过程中对蛋氨酸需要量较少，孙康玉[23]在培养 BMECs 的过程中用蛋氨酸二肽等量替代游离蛋氨酸或替代 1/2 游离蛋氨酸，*CSN*3 基因表达也均出现抑制，本研究结果与其类似。

小肽的运输主要依赖于 *PepT*1 和 *PepT*2 2 种小肽转运载体，2 种小肽转运载体都有显著的底物特异性，同时具有多个跨膜结构[25-26]。本试验结果表明，适宜浓度的蛋氨酸三肽能促进 *PepT*1 和 *PepT*2 基因的表达，证明 BMECs 能够摄取和利用比二肽更长的肽链来合成乳蛋白及细胞增殖所需的骨架蛋白质等，从而达到促进 BMECs 增殖和酪蛋白合成的目的。然而，BMECs 对小肽的具体利用机制以及酪蛋白合成中小肽与游离氨基酸的最优添加比例，都有待于进一步研究，同时其确切的机理仍需进一步探讨。

4 结 论

蛋氨酸三肽能够调节 BMECs 的增殖，培养基中添加 60 μg/mL 蛋氨酸三肽培养 24 h 时对 BMECs 相对增殖率最高，同时可以促进酪蛋白和 2 种小肽转运载体基因的表达。证明蛋氨酸三肽可以通过这 2 种小肽载体转运至细胞内，并参与乳腺细胞中乳蛋白的合成。

参考文献：

[1] FARRELL H M Jr,JIMENEZ-FLORES R,BLECK G T,et al.Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision[J].Journal of Dairy Science,2004,87(6):1641–1674.

[2] PAYNE J W,MICROORGANISMS,NITROGEN S.Transport and utilization of amino acids,peptides,proteins,and related substrates[M].New York:John Wiley and Sons Ltd.,1980.

[3] TAGARI H,WEBB K E,Jr.,THEURER T,et al.Mammary uptake,portal drained visceral flux,and hepatic metabolism of free and peptide-bound amino acids in COWS fed steam-faked or dry rolled sorghum grain diets[J].Journal of Dairy Science,2008,91(2):679–697.

[4] BACKWELL F R,BEQUETTE B J,WILSON D,et al.Evidence for the utilization of peptides for milk protein synthesis in the lactating dairy goat *in vivo*[J].The American Journal of Physiology,1996,271(4):R955–R960.

[5] WANG S P.Peptides as amino acid sources for the synthesis of secreted proteins by mammary tissue explants and cultured mammary epithelial cells[D].Ph.D.Thesis.Virginia:Virginia Polytechnic Institute and State University,1994.

[6] 高学军,毕微微,林叶,等.四种二肽对奶牛乳腺上皮细胞增殖及 β-酪蛋白分泌的影响[J].东北农业大学学报,2013,44(3):16–20.

[7] 周苗苗.奶牛乳腺中小肽的摄取及其在乳蛋白合成中的作用[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2011.

[8] 崔艳.泌乳奶牛乳腺中小肽转运载体的鉴定及其生理特性的研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2015.

[9] LEIBACH F H,GANAPATHY V.Peptide transporters in the intestine and the kidney[J].Annual Review of Nutrition,1996,16(1):99–119.

[10] FEI Y,KANAI Y,NUSSBERGER S,et al.Expression cloning of a mammalian

proton-coupled oligopeptide transporter[J].Nature,1994,368(6471):563–566.
[11] MABJEESH S J,KYLE C E,MACRAE J C,et al.Vascular sources of amino acids for milk protein synthesis in goats at two stages of lactation[J].Journal of Dairy Science,2002,85(4):919–929.
[12] 郑勇唐,贲昆龙.测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立[J].免疫学杂志,1992,8(4):266–269.
[13] ZHOU Y,AKERS R M,JIANG H.Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells[J].Journal of Dairy Science,2008,91(1):100–108.
[14] 张兴夫.不同日粮模式对泌乳奶牛乳腺乳蛋白合成影响的研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2013.
[15] 常晨城.蛋氨酸及含蛋氨酸二肽对奶牛乳腺上皮细胞内乳蛋白合成相关基因表达的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2015.
[16] GRONEBERG D A,DÖRING F,THEIS S,et al.Peptide transport in the mammary gland:expression and distribution of *PEPT*2 mRNA and protein[J].American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,2002,282(5):E1172–E1179.
[17] 魏宗友,徐柏林,郝志敏,等.氨基酸转运载体的研究进展[J].中国饲料,2010(13):19–25.
[18] SMITH D E,CLÉMENÇON B,HSDIGER M A.Proton-coupled oligopeptide transporter family *SLC*15:physiological,pharmacological and pathological implications[J].Molecular Aspects of Medicine,2013,34(2/3):323–336.
[19] NEWSTEAD S,DREW D,CAMERON A D,et al.Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters,*PepT*1 and *PepT*2[J].The EMBO Journal,2011,30(2):417–426.
[20] 于辉,李华,关绣霞,等.小肽转运载体的分子营养学的研究进展[J].佛山科学技术学院学报:自然科学版,2005,23(3):77–80.
[21] ZHOU M M,WU Y M,LIU H Y,et al.Effects of tripeptides and lactogenic hormones on oligopeptide transporter 2 in bovine mammary gland[J].Journal of Animal Physiology and

Animal Nutrition,2010,95(6):781–789.
[22] ZHOU M M,WU Y M,LIU H Y,et al.Effects of phenylalanine and threonine oligopeptides on milk protein synthesis in cultured bovine mammary epithelial cells[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2015,99(2):215–220.
[23] 孙康玉.小肽对奶牛乳腺细胞乳蛋白合成的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.
[24] THORN D C,MEEHAN S,SUNDE M,et al.Amyloid fibril formation by bovine milk kappa-casein and its inhibition by the molecular chaperones alpha(S-) and beta-casein[J].Biochemistry,2006,44(51):17027–17036.
[25] TEROVA G CORÀ S,VERRI T,et al.Impact of feed availability on *PepT*1 mRNA expression levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J].Aquaculture,2009,294(3/4):288–299.
[26] CHEN H,PAN Y X,WONG E A,et al.Molecular cloning and functional expression of a chicken intestinal peptide transporter (c*PepT*1) in *Xenopus* oocytes and Chinese hamster ovary cells[J].Journal of Nutrition,2002,132(3):387–393.

Effects of Methionine Tripeptide on Expression Levels of Casein and Small Peptide Transporters Genes in Bovine Mammary Epithelial Cells

GUO Chunli DAN Ni CAO Qina Khas-Erdene AO Changjin*
（*College of Animal Science*， *Inner Mongolia Agricultural University*， *Hohh*ot 010018，*China*）

Abstract: This experiment aimed to study the effects of methionine tripeptide (Met-Met-Met) on expression levels casein and small peptide transporters genes in bovine mammary epithelial cells (BMECs). Using BMECs isolated with collagenase digestion method as the model, different concentrations [0 (control), 40, 50, 60, 70, and 80 μg/mL] of Met-Met-Met were added in culture medium in different treatments and cultured for 24, 48, and 72 h, respectively, and each treatment had 5 replicates with 1 culture pore per replicate. The experiment was repeated twice. Relative growth rate was measured to determine the optimal culture time. Different concentrations [0

*Corresponding author, professor, E-mail: changjinao@sohu.com （责任编辑 王智航）

(control), 40, 50, 60, 70, and 80 μg/mL] of Met-Met-Met were added in culture medium in different treatments and cultured for the optimal time, and each treatment had 3 replicates with 1 culture pore per replicate. The experiment was repeated for three times. Expression levels of casein genes were determined by real-time PCR to determine the optimal Met-Met-Met concentration. Using the optimal culture time and Met-Met-Met concentration to culture cells, and culture medium without Met-Met-Met was used for control. Each treatment had 3 replicates with 1 culture pore per replicate. The experiment was repeated three times. Expression levels of peptide transporter genes were examined. The results showed as follows: relative growth rate was the highest when cells were treated with Met-Met-Met for 24 h; with the suitable culturing time of 24 h, when adding 60 μg/mL Met-Met-Met, expression levels of α_{s1}-casein and β-casein gens were the highest, meanwhile expression levels of small peptide transporter 1 and 2 genes were significantly higher than those in control treatment （P<0.05）. To sum up, adding 60 μg/mL of Met-Met-Met can increase expression levels of casein and peptide transporter genes in BMECs.

Key word： methionine tripeptide; bovine mammary epithelial cells; casein; small peptide transporters